

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Prof.Dr.P.Klein

QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN DES VOLLKOMPLEMENTS
UND DER ERSTEN UND ZWEITEN KOMPLEMENTKOMPONENTE
DES HUMANSERUMS

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Beate Runkel

aus Koblenz

Mainz 1974

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktor: Prof.Dr.P.Klein

QUANTITATIVE BESTIMMUNGEN DES VOLLKOMPLEMENTS
UND DER ERSTEN UND ZWEITEN KOMPLEMENTKOMPONENTE
DES HUMANSERUMS

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Beate Runkel
aus Koblenz

Mainz 1974



Fachbereichsdekan: Professor Dr.P. Klein

Referent: Professor Dr.W. Opferkuch

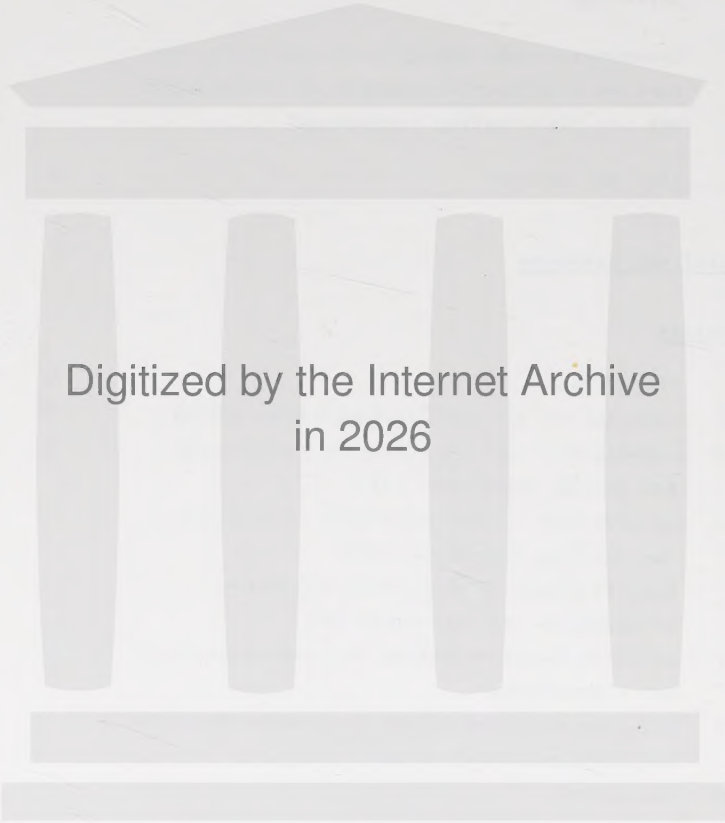
Korreferent: Professor Dr.Dr.K.H.Meyer zum Büschenfelde

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.1974

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>Einleitung</u>	
1. Klinische Bedeutung des Komplementsystems und Möglichkeiten seiner quantitativen Erfassung	1
2. Unterschiedliche hämolytische Aktivität der zweiten Komplementkomponente in Abhängigkeit von den "late acting components"	5
3. Ziel der Arbeit	6
<u>Material und Methoden</u>	8
<u>Ergebnisse</u>	
1. Normalwerte	18
1.1 Normalwerte für das Vollkomplement (CH50)	18
1.2 Normalwerte für die effektive Molekülzahl der ersten Komponente (C1)	19
1.3 Normalwerte für die effektive Molekülzahl der zweiten Komponente (C2)	20
2. Vergleichende C2 Bestimmung mit Meer- schweinchen- und Ratten-C-EDTA	21
2.1 Relation zwischen beiden Bestimmungsmethoden bei Normalseren	21
2.2 Relation zwischen beiden Bestimmungsmethoden bei pathologischen Seren	22
2.3 Vergleich	25
<u>Diskussion</u>	27
<u>Zusammenfassung</u>	34
<u>Literaturverzeichnis</u>	35



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552610_0068

EINLEITUNG

1. Klinische Bedeutung des Komplementsystems und Möglichkeiten seiner quantitativen Erfassung

Das Komplement ist ein System von 11 Eiweißkörpern, die mit C1 - C9 bezeichnet werden, und von denen die erste Komponente aus den drei Untereinheiten C1q, C1r und C1s besteht.¹⁾ Dieses System ist normalerweise im Serum jedes Warmblütlers vorhanden. Die einzelnen Komplementkomponenten liegen im Serum in inaktiver Form vor. Über eine Aktivierung der ersten Komponente durch einen Antigen-Antikörperkomplex (AgAk) wird eine kaskadenartige Reaktion aller neun Faktoren ausgelöst, die schließlich bei Vorliegen eines zellulären Immunkomplexes über einen Membranschaden zur Zell-Lyse führen kann. Neuerdings sind auch andere, von AgAk-Komplexen unabhängige Mechanismen bekannt, die eine Komplementreaktion in Gang setzen. So können hochmolekulare Polysaccharide, Enzyme, Cobra-toxin und verschiedene Endotoxine über den sog. "alternate pathway" unter Aussparung von C1, C4 und C2 über eine Aktivierung der dritten Komponente die Reaktionskette auslösen (Lit. siehe Bitter-Suermann, 1972).

Die klinische Bedeutung des Komplementsystems beruht nach unserer heutigen Kenntnis zum einen auf der Infektionsabwehr und Zell-Lyse und zum anderen auf der Auslösung einer Entzündungsreaktion. Für das erstere macht man Aktivitäten des gebundenen Komplementmaterials an der Zelloberfläche verantwortlich, für das letztere biologisch aktive Spaltprodukte, die während des Reaktionsablaufs freigesetzt werden (siehe Abb.).

¹⁾ Nomenklatur entsprechend dem Vorschlag der WHO:
"Nomenclature of Complement", Bull. WHO, 39, 935 (1968)

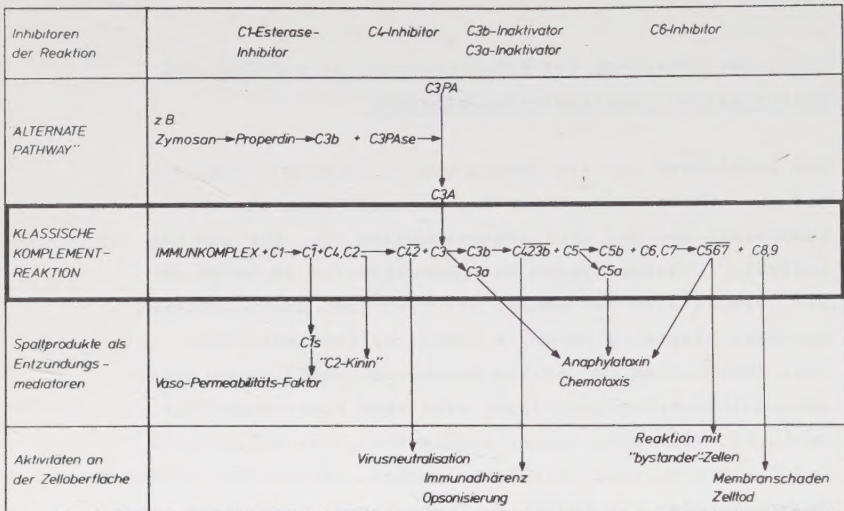


Abb. 1: Schematische Darstellung der Komplementreaktion
(Wellek und Opferkuch, 1973)

In letzter Zeit werden immer mehr Erkrankungen im Zusammenhang mit einer Komplementaktivierung gesehen. Zu diesen zählen Krankheitsbilder, bei denen Immunkomplexe zu einer Aktivierung des Komplementsystems und dadurch zur Auslösung einer Entzündung führen. Hierzu gehören die Immuvaskulitis (Dixon et al, 1958; Cochrane, 1963; Kniker and Cochrane, 1965), die akute Glomerulonephritis (Gewurz et al, 1967, 1968; Kohler and Ten-Bensel, 1969), der Lupus Erythematodes (Lange et al, 1960; Tan and Kunkel, 1966; Koffler et al, 1967; Schur and Sandson, 1968), die rheumatoide Arthritis (Hedberg, 1963; Zvaifler et al, 1963; Lundh et al, 1970) und einige Fälle von hämolytischen Anämien und Thrombozytopenien (Harboe et al, 1963; Shulman, 1964; Boyer, 1967).

Neben einer Bildung von Immunkomplexen kann auch eine Aktivierung über den "alternate pathway" von pathogener Bedeutung sein. Bei der hypokomplementärischen membranoproliferativen Glomerulonephritis nimmt man einen derartigen Aktivierungsmechanismus an, da man bei diesen Patienten im Serum keine Veränderungen der zuerst reagierenden Komplementfaktoren C1, C4 und C2, sondern nur Erniedrigungen von C3 und C5 nachweisen konnte (Gewurz et al, 1968; Kohler and Ten-Bensel, 1969; Ruddy et al, 1972).

Während den oben beschriebenen Erkrankungen eine Aktivierung des Komplementsystems zugrunde liegt, können auch genetisch bedingte Defekte im Komplementsystem Ursache für pathologische Erscheinungen sein. Der bekannteste Defekt dieser Art ist der C1-Esterase-Inhibitor-mangel beim hereditären angioneurotischen Ödem (Landerman et al, 1962; Donaldson and Evans, 1963; Gottstein et al, 1967). Weiter werden in der Literatur Familien beschrieben, bei denen ein Mangel oder fast völliges Fehlen der zweiten Komponente vorliegt, bei denen aber das klinische Erscheinungsbild unauffällig ist (Klemperer et al, 1966; Klemperer, 1969; Ruddy et al, 1970). Ein angeborener Mangel des C3b Inaktivators wird bei einem Patienten für das Auftreten wiederholter Infektionen verantwortlich gemacht. Das Fehlen dieses Inaktivators führte über eine verstärkte Aktivierung des "alternate pathway" durch C3b zu einem erhöhten Katabolismus von C3 (Alper et al, 1971; Abramson et al, 1971; Alper et al, 1972). Bei einem C5-Defekt wird jedoch eine erhöhte Infektanfälligkeit beschrieben (Miller et al, 1968; Miller and Nilson, 1968).

Um bei den aufgeführten Krankheitsbildern eine Komplementbeteiligung nachzuweisen und damit die Diagnose zu sichern, sind folgende Verfahren entwickelt worden:

1. der Immunhistochemische Nachweis von gebundenem Komplementmaterial,

2. die Bestimmung der Synthese- und Abbaurate einzelner Komplementfaktoren,
3. Analysen des Serumkomplementspiegels.

Mit der ersten Methode wird das an Immunkomplexe gebundene Komplement durch Biopsie der erkrankten Organe nachgewiesen. Hiermit kann eine genaue Lokalisation des Krankheitsherdes angegeben werden. Mit dem zweiten Verfahren wird festgestellt, ob eine Störung des Gleichgewichts zwischen Synthese und Abbau der einzelnen Komplementkomponenten vorliegt, die zu einer Veränderung des Serumspiegels führen kann. Diese beiden Untersuchungsmethoden sind sehr aufwendig und haben deshalb keine Anwendung als routinemäßige Laboruntersuchung gefunden. Einfacher durchzuführen ist dagegen die Analyse des Serumkomplementspiegels, bei dem einzelne Komplementfaktoren und das Vollkomplement erfaßt werden. Eine Erniedrigung des Vollkomplements im Serum läßt auf einen gesteigerten Verbrauch infolge einer Aktivierung schließen. Während eine Erniedrigung der ersten Komplementkomponenten C1, C2 und C4 für eine Aktivierung durch Immunkomplexe spricht, kann bei normalem Titer dieser Faktoren und einem erniedrigten CH50 eine Aktivierung über den "alternate pathway" in Betracht gezogen werden.

Einzelne Komplementkomponenten können mit Hilfe der Immundiffusionstechnik nach Mancini (1965) quantitativ erfaßt werden. Da dabei nur Proteinmengen bestimmt werden, kann eine Unterscheidung in hämolytisch aktive und inaktive Moleküle nicht getroffen werden.

Zur Bestimmung der hämolytischen Aktivität des Vollkomplements wird die 1961 von Mayer beschriebene CH50 Methode angewandt. Bei dieser Bestimmung wird die Lyse sensibilisierter Hammelerythrozyten in Abhängigkeit von bestimmten Parametern durch verschiedene Serumverdünnungen gemessen und das

Ergebnis, der Titer, als das Reziproke der Verdünnung angegeben, die 50 % der eingesetzten Zellen lysiert.

Die Messung der hämolytischen Aktivität einzelner Komplementkomponenten wurde zuerst mit sog. R-Reagentien durchgeführt. Dies waren Seren, bei denen die zu testende Komponente selektiv zerstört war (Mayer, 1961). Sie erwiesen sich jedoch als ungeeignet für vergleichende quantitative Bestimmungen, da in diesen Seren auch andere Komponenten in unterschiedlichem Maße in Mitleidenschaft gezogen wurden. Zudem wurde noch eine Abhängigkeit des Meßergebnisses von der eingesetzten Zellmenge festgestellt (Mayer, 1965). Die Charakterisierung der zur Lyse führenden Komplementreaktion als Eintreffervorgang, genauere Untersuchung und Darstellung der Einzelschritte innerhalb des Reaktionsablaufs brachten schließlich die Möglichkeit, einzelne Komponenten in ihrer hämolytischen Aktivität zu erfassen. Zu dieser Bestimmung "effektiver Moleküle" werden spezifische Hammelerythrozyten-Intermediärkomplexe mit funktionell reinen Komplementkomponenten und ein Überschuß an "late acting components" (C3 - C9) benötigt. Auf dieser Basis wurden Bestimmungsmethoden für C1 (Borsos and Rapp, 1963), C2 (Borsos et al, 1961; Austen and Beer, 1964) und für C4 (Ruddy and Austen, 1967) entwickelt und durch Standardisierung und Einführung rationeller Arbeitsweisen ihre Anwendung als Routineuntersuchung ermöglicht (Ringelmann et al, 1969). Die Hauptrichtlinien und Erfordernisse zu diesen Bestimmungsmethoden sind 1970 von Rapp und Borsos ausführlich zusammengestellt worden.

2. Unterschiedliche hämolytische Aktivität der zweiten Komplementkomponente in Abhängigkeit von den "late acting components"

Cooper et al (1970) konnten feststellen, daß bei der Messung der vom EA C14-Komplex aufgenommenen C2 Menge mit radiochemischen Nachweismethoden ein sehr viel höherer Wert be-

stimmt wird, als bei der hämolytischen Aktivitätsmessung nach der oben beschriebenen Methode bei Verwendung von Meerschweinchen-C-EDTA.¹⁾ Dies bedeutet, daß ein Teil des gebundenen C2 inaktiv bleibt. Zur Erfassung dieses inaktiven Anteils lieferte Miyakawa (1969) einen bedeutenden Beitrag. Er ersetzte in der üblichen Versuchsanordnung gp C-EDTA durch Ratten-C-EDTA und erzielte dadurch eine Erhöhung des hämolytischen C2 Titors im Meerschweinchen-serum um das Zehn- bis Zwanzigfache. Vergleichende Titrationen von Humanserum erbrachten eine Steigerung um das Acht- bis Dreizehnfache bei Verwendung von Ratten-C-EDTA (Opferkuch et al, 1971). Die Umrechnung der mit Ratten-C-EDTA bestimmten effektiven Moleküle in Proteinmengen und ihr Vergleich mit dem immunchemisch ermittelten C2-Proteingehalt des Serums zeigte folgende Ergebnisse: Jedes Molekül C2 kann im Meerschweinchen-serum durch seine hämolytische Aktivität nachgewiesen werden. Im Humanserum können von den 4,5 % von der Zelle aufgenommenen nativen C2 50 %, von den 20 % aufgenommenen oxydierten C2 100 % hämolytisch erfaßt werden (Opferkuch et al, 1971).

3. Ziel der Arbeit

Die Bestimmung des Vollkomplements und die Messung effektiver Moleküle einzelner Komplementkomponenten stellen reproduzierbare Methoden dar, die in der allgemeinen Labor-diagnostik Eingang gefunden haben. Um pathologische Veränderungen der einzelnen Titer feststellen zu können, müssen Normalwerte und deren physiologische Streuung bekannt sein. In der Literatur werden teilweise recht unterschiedliche Angaben über sog. Normalwerte gemacht, so daß eigene

¹⁾ Meerschweinchen-C-EDTA ist Meerschweinchenkomplement, bei dem die Faktoren C1, C2 und C4 durch einen EDTA-(Athyliendiamintetraacetat) Puffer blockiert sind. Abkürzung: gp C-EDTA (gp = engl.: guinea pig).

Untersuchungen notwendig werden, die aus einem großen Kollektiv klinisch gesunder Personen Normalwerte für das Vollkomplement sowie für die erste und zweite Komplementkomponente ermitteln.

Im weiteren wird untersucht, welche Ursache für die unterschiedliche hämolytische Effektivität der zweiten Komplementkomponente verantwortlich ist. Dabei bleibt die Frage, ob bei der Verwendung von Ratten-C-EDTA möglicherweise eine andere C2 Population erfaßt wird, als die, die nach der ursprünglichen Methode mit gp C-EDTA bestimmt wird. Während das eine C2 Molekül sich durch seine alleinige Reaktion mit Ratten-C-EDTA auszeichnen könnte, würde das andere sowohl mit Ratten- als auch mit gp C-EDTA reagieren. Die Annahme, daß möglicherweise ein Polymorphismus des C2 Moleküls die unterschiedlichen Meßergebnisse in Abhängigkeit von der Herkunft der "late acting components" bedingt, wird durch die Arbeit von Colten (1970) unterstützt, der für C2_{gp} zwei verschiedene isoelektrische Punkte nachweisen konnte. Wie sich eine Komplementaktivierung im Rahmen eines pathologischen Prozesses auf die beiden postulierten C2 Populationen auswirken könnte, ist Gegenstand meiner Untersuchungen. Dazu soll die durch die Titration mit Ratten-C-EDTA erhaltene Steigerungsrate für C2 bei einer Gruppe von Normalseren und einer Gruppe pathologischer Seren bestimmt und miteinander verglichen werden. Mögliche Unterschiede könnten durch eine selektive Veränderung einer Komponentenart durch den Krankheitsprozeß bedingt sein und die Annahme zweier verschiedener Arten von C2 unterstützen.

MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Geräte

- 1.1.1 Einweg-Kunststoff-Reaktionsgefäße, 1,5 ml Volumen, Fa. Eppendorf;
- 1.1.2 Mikroliterpipetten, Fa. Eppendorf;
- 1.1.3 Rotationsmischer, Fa. Eppendorf;
- 1.1.4 Zentrifuge, 16000 UpM entsprechend ca. 15000 x g, 1 Sek. Anlaufzeit, 15 Sek. Auslaufzeit, Zentrifugendauer insgesamt 30 Sek.;
- 1.1.5 Spektralphotometer Beckmann DB-G;

1.2 Puffer und Stammlösungen

- 1.2.1 VBS (Veronal buffered saline) nach Mayer (1961)
pH 7,3; Ionenstärke 0,15

Stammpuffer, VBS-konz.

NaCl (Fa. Merck Nr. 6404)	88,3 g
Na-5,5-diäthyl-barbiturat (Fa. Merck Nr. 6318)	10,19 g
1n HCl	34,58 ml
Aqua dem. ad	2000,00 ml
pH 7,3 K 14,5-15	
Vor Gebrauch 1:5 mit Aqua dem. verdünnen	

Gebrauchspuffer, VBS

VBS-konz.	400 ml
2,0 m $MgCl_2$	1 ml
0,3 m $CaCl_2$	1 ml
Aqua dem. ad	2000 ml
pH 7,3 K 15	

Endkonzentration: $Ca^{++} = 0,00015$ m
 $Mg^{++} = 0,001$ m
 $Na^+ = 0,15$ m

1.2.2 S-VBS (Veronal buffered saline mit Saccharose)
nach Rapp (1963), pH 7,3; Ionenstärke 0,065

Stammpuffer, S-VBS-konz.

D-(+)-Saccharose (Fa. Merck Nr. 7653)	486,1 g
Na-5,5-diäthyl-barbiturat (Fa. Merck Nr. 6318)	5,095 g

mit 2n HCl auf pH 7,3 einstellen

Aqua dem.	ad	1000,0 ml
-----------	----	-----------

Gebrauchspuffer, S-VBS

0,6 g Gelatine (in Aqua dem.gelöst)

VBS-konz.		160	ml
S-VBS konz.		240	ml
2,0 m $MgCl_2$		1	ml
0,3 m $CaCl_2$		1	ml
Aqua dem.	ad	2000	ml

pH 7,3; K 6,5

Endkonzentration: Ca^{++}	= 0,00015 m
Mg^{++}	= 0,001 m
Na^{++}	= 0,065 m

1.2.3 EDTA-Stammlösung 0,2 m

74,6 g Na_2H_2 EDTA (Fa. Merck, Titriplex III, 8418)
in 100 ml H_2O lösen, pH auf 7,65 mit 2n NaOH ein-
stellen, dabei im Wasserbad auf 70°C erwärmen, ad
1000 ml mit H_2O auffüllen. pH-Wert nach dem Ab-
kühlen evtl. nachstellen.

VBS-EDTA (Veronal buffered saline mit 0,01 m NaOH)

Gelatine in Aqua dem. gelöst	0,6	g
EDTA 0,2 m	200	ml
VBS-konz.	320	ml
Aqua dem. ad	2000	ml

pH 7,5; -7,6; K 15

1.2.4 Stammlösung von 0,3 m CaCl_2 - bzw. 2,0m MgCl Lösung

1.2.5 Alseverlösung zur Aufbewahrung von Hammelerythrozyten:

Glukose (Fa. Merck Nr. 6448)	20,5 g
Na-Citrat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,92 g
NaCl	4,2 g
Citronensäure (Fa. Merck Nr. 244)	0,55 g
Aqua dem. ad	1000 ml
pH 6,1; K 11,2	
Die Lösung wird durch ein steriles Seitzfilter filtriert und steril aufbewahrt.	

1.3 Komplementreagenzien

1.3.1 Ambozeptor

Käuflicher Ambozeptor der Behring-Werke (Charge RLB 24,
Titer 4000 E/ml)

1.3.2 C1_{gp}

C1_{gp} wird durch Ultrazentrifugation nach der Methode von
Colten (1969) hergestellt.

1.3.3 Vollkomplement

1. Meerschweinchenblut wird in Zentrifugengläsern
gesammelt, ca. 18 Stunden bei 4°C gerinnen gelassen,
abgesert und bei -70°C tiefgefroren.
2. Rattenblut wird in Zentrifugengläsern gesammelt,
ca. 2 Stunden gerinnen gelassen, abgesert und bei
 -70°C tiefgefroren.

1.3.4 gp C-EDTA

Meerschweinchenkomplement wird mit VBS-EDTA im Verhält-
nis 1:33 verdünnt.

Ratten-C-EDTA

Rattenkomplement wird mit VBS-EDTA im Verhältnis 1:2 ver-
dünnt, wobei pro ml Rattenserum 0,05 ml VBS-EDTA durch
0,5 m EDTA ersetzt werden.

1.4 Zellen und Zellintermediärprodukte

1.4.1 Erythrozyten (E)

150 ml Hammelblut werden in 150 ml steriler Alsever-Lösung aufgefangen (Alsever-Lösung vorher steril durch ein Seitzfilter filtrieren) und mindestens 7 Tage bei 4°C gelagert.

70 ml Hammelerythrozyten in Alsever werden steril entnommen und abzentrifugiert (5 Min., 4°C, 3000 U/Min., ohne Bremse). Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes und Trennung der Leukozytenschicht mit einer Pipette vom Sediment werden die Erythrozyten 3mal in ca. 300 ml VBS-EDTA gewaschen und anschließend in 360 ml VBS-EDTA aufgenommen und 10 Min. bei 37°C inkubiert. Danach werden sie abzentrifugiert, 1mal in 300 ml VBS-EDTA gewaschen und mit Hilfe einer Hämoglobineichkurve bei 412 nm auf 1×10^9 E/ml eingestellt.

1.4.2 Herstellung von sensibilisierten Erythrozyten (EA)

Zu gewaschenen und mit VBS-EDTA auf 1×10^9 E/ml eingestellten Erythrozyten wird das gleiche Volumen einer 16,2 Ambozeptoreinheiten enthaltenden Ambozeptorverdünnung unter ständigem Rühren gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C werden die Zellen abzentrifugiert und 1mal in VBS und 2mal in S-VBS gewaschen. In S-VBS werden sie auf 5×10^8 EA/ml eingestellt.

1.4.3 Herstellung von EAC4-Zellen

50 ml EA-Zellen (5×10^8 EA/ml) werden mit 2,0 ml gereinigtem C1_{gp} (entsprechend 400 eff. Mol. C1/Zelle) 15 Min. bei 0°C inkubiert, anschließend mit 130 ml C-EDTA (Humanserum mit VBS-EDTA 1:5 verdünnt) bei 0°C gemischt und weitere 15 Min. bei 0°C inkubiert. C-EDTA wurde vorher auf 0°C abgekühlt. Nach zweimaligem Waschen in eiskaltem VBS-EDTA werden die Zellen in VBS-EDTA aufgenommen und 15 Min. bei 30°C inkubiert, 2mal in S-VBS gewaschen und in S-VBS auf $1,3 \times 10^8$ EAC4/ml eingestellt.

2. Methoden

2.1 Bestimmung des Vollkomplements

Um die hämolytische Aktivität des Vollkomplements im Serum angeben zu können, benötigt man standardisierte sensibilisierte Hammelerythrozyten in VBS-Puffer und verschiedene Serumverdünnungen. Dazu werden in S-VBS aufbewahrte EA-Zellen (5×10^8 EA/ml) zweimal in VBS-Puffer gewaschen und mit VBS erneut auf 5×10^8 EA/ml eingestellt. Serumverdünnungen werden mit VBS-Puffer im Verhältnis 1:11, 1:22, 1:47,8 und 1:66 hergestellt.

Zu 100 µl Serumverdünnung gibt man 550 µl VBS-Puffer und 100 µl der in VBS suspendierten EA-Zellen. Nach Inkubation während 60 Min. in einem Wasserbad von 37°C mit gelegentlichem Schütteln werden die nicht lysierten Zellen abzentrifugiert und der Überstand bei 514 mµ photometrisch gemessen. Den Extinktionswert bezeichnet man als OD_{Probe} .

Kontrollen:

Von den beiden mitangesetzten Kontrollen besteht die erste aus 650 µl VBS-Puffer und 100 µl EA-Zellen, dabei wurde das Vollkomplement durch VBS ersetzt. Bei der zweiten Kontrolle, dem 100 % Lyse-Wert, werden Vollkomplement und Puffer durch H_2O ersetzt.

Berechnung der CH50 E/ml:

Der Extinktionswert wird nach der folgenden Gleichung in % Hämolyse (= y) umgerechnet:

$$\frac{OD_{\text{Pr}} \times 100}{OD_{100 \%}} = \% \text{ Lyse} = y$$

Der für diesen Lysegrad entsprechende $y/1-y$ Wert wurde einer Tabelle aus: Kabat and Mayer "Experimental Immunochemistry" entnommen. Er ergibt in Abhängigkeit von bestimmten Reaktionsbedingungen nach Multiplikation mit der Verdünnung den Wert der im Serum vorhandenen CH50-Einheiten pro ml.

2.2 Bestimmung der effektiven C1 Moleküle

Versuchsbeschreibung:

100 μ l einer Serumverdünnung mit S-VBS Puffer werden mit 100 μ l EAC₄gp Zellen ($1,3 \times 10^8$ EAC₄/ml) eine Stunde lang unter gelegentlichem Schütteln bei 30°C inkubiert. Dann gibt man 100 μ l C2 (50 eff.Mol/ml), die erst auf 30°C vorgewärmt werden, dazu. Nach 10-minütiger Inkubation bei 30°C werden die Proben mit 1 ml C-EDTA aufgefüllt und wiederum eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren der nicht lysierten Zellen wird der Überstand photometriert. Die Extinktion bezeichnet man als OD_{Pr}.

Kontrollen:

CB (cell blank): 100 μ l EAC₄, 200 μ l S-VBS, 1000 μ l VBS-EDTA, CBC (cell blank u. C-EDTA): 100 μ l S-VBS, 100 μ l C2, 1000 μ l gpC-EDTA.

100 % Lyse: 100 μ l EAC₄, 1200 μ l H₂O.

Berechnung der effektiven Moleküle:

Die Grundlage für die Berechnung der effektiven Moleküle bildet die "one hit" Theorie, die besagt, daß ein hämolytisch aktiver Bezirk an der Zelloberfläche zur Zell-Lyse ausreicht (Mayer, 1961). Dies bedeutet, daß die Reaktion eines aktivierten Bezirkes mit einem Komponenten-Molekül zur Lyse führt, falls alle restlichen Komponenten im Überschuß vorliegen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit,

aus dem Lysegrad auf die Zahl der in die Reaktion eingebrachten Komponentenmoleküle zu schließen. Bei der Reaktion $EA + C1 \longrightarrow EAC1$ werden die C1 Moleküle entsprechend der Poisson-Verteilung mit den EA-"sites"¹⁾ reagieren, wenn gewährleistet ist, daß alle Moleküle unabhängig voneinander reagieren und eine genügend große Zahl von EA-"sites" zur Verfügung steht. Somit ergibt sich folgende Beziehung zwischen dem Grad der Lyse und der Durchschnittszahl der Läsionen pro Zelle:

$$y = 1 - e^{-z}$$

y entspricht dem Lysegrad, e der Basis des natürlichen Logarithmus und z der Zahl der durchschnittlichen Läsionen pro Zelle. Umgewandelt lautet die Gleichung:

$$-\ln(1-y) = z$$

y erhält man, indem man die bei 412µm gemessene Extinktion um den Betrag der Eigenlyse und Farbe (CBC) verringert und als Bruchteil der korrigierten Voll-Lyse berechnet. Somit ergibt sich folgende Formel:

$$-\ln\left(1 - \frac{OD_{Pr} - OD_{CBC}}{OD_{100\%} - OD_{CB}}\right) = z$$

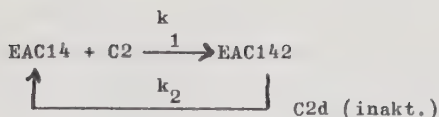
Ein z-Wert von 1 bedeutet 63 % Lyse, da bei $z=1$, $y=1-e^{-1}=0,63$ ist. Bei diesem z-Wert ist pro Zelle ein effektives Komponentenmolekül vorhanden. Aus dem z-Wert, der Zellzahl und der Serumverdünnung lassen sich nun die effektiven Moleküle C1/ ml berechnen.

2.3

Bestimmung der effektiven C2 Moleküle

Die Bestimmung der effektiven C2 Moleküle basiert auf folgender Reaktion (Borsos et al, 1961):

¹⁾ "site" bedeutet ein auf der EA-Zelle befindlicher reaktiver Elementarbezirk.



k_1 und k_2 sind Konstanten für die Bildungs- bzw. Zerfallsrate des EAC142 Komplexes. Dieser durch die Reaktion von C2 mit EAC14 entstandene Komplex ist instabil und zerfällt unter Verlust seiner hämolytischen Aktivität wieder in ein inaktives C2 Bruchstück (C2d) und EAC14 (Miller and Mayer, 1968). Wegen des raschen Zerfalls des hämolytisch aktiven Komplexes ist es nötig, bei der Bestimmung der effektiven Molekülzahl den Zeitpunkt zu treffen, an dem die Zahl der gebildeten SAC142¹⁾ ihr Maximum erreicht hat ($t_{\max}$). Auf Grund der Kinetik dieser Reaktion muß man nun zur Berechnung der in die Reaktion eingebrachten effektiven Moleküle die Zahl der hämolytisch aktiven "sites", die in der Zeit von $t_{\max}$ erhalten wurde, durch einen Korrekturfaktor dividieren. Rapp und Borsos (1970) haben in einer Tabelle Korrekturfaktoren für Zeiten zwischen 20,3 und 2,2 Min zusammengestellt. Die entsprechenden Korrekturfaktoren liegen zwischen 0,54 und 0,94. Bei meinen Versuchen lagen die Zeiten für die $t_{\max}$ zwischen 1,5 und 2 Minuten. Der entsprechende Korrekturfaktor liegt also noch über 0,94 und würde eine Änderung des gemessenen Wertes von 4-5% hervorrufen, die jedoch im Bereich der täglichen Streuung liegt und deshalb bei der Berechnung der effektiven Moleküle vernachlässigt wurde.

2.3.1 Bestimmung mit gpc-EDTA

100 μ l Serumverdünung in S-VBS und 200 μ l EAC⁴_{hu} Zellen ($0,65 \times 10^8$ EA/ml) werden getrennt bei 30°C kurz vorgewärmt, anschließend zusammengegeben und während einer Zeit, die der $t_{\max}$ entspricht, inkubiert. Nach Ablauf

¹⁾S = site

dieser Zeit gibt man 1,0 ml gpC-EDTA dazu und inkubiert alles unter gelegentlichem Schütteln 60 Minuten bei 37°C. Die nicht lysierten Zellen werden abzentrifugiert und die Extinktion des Überstandes photometrisch bestimmt.

Kontrollen:

CB: 200 µl EAC14 hu, 100 µl VBS-S, 1000 µl VBS-EDTA

CBC: 200 µl EAC14 hu, 100 µl VBS-S, 1000 µl gpC-EDTA

100 % Lyse: 200 µl EAC14 hu, 1100 µl H₂O.

Die Berechnung der effektiven Moleküle erfolgt auf die gleiche Art, wie die oben beschriebene Berechnung der effektiven Moleküle C1.

2.3.2 C2 Bestimmung mit Ratten-C-EDTA

Der Versuchsansatz entspricht der oben beschriebenen C2 Bestimmung, nur wird eine höhere Serumverdünnung gewählt und gpC-EDTA durch Ratten-C-EDTA ersetzt. Wegen der starken Eigenfarbe des Rattenserums kann der Hämoglobingehalt der lysierten Zellen nicht gemessen werden. Man bestimmt deshalb gleich den Anteil der nicht lysierten Zellen und berechnet daraus die effektive Molekülzahl. Dazu wird nach Abzentrifugieren der unlysierten Zellen der Überstand vorsichtig entfernt, die verbliebenen Zellen in 1 ml VBS-EDTA gewaschen, erneut abzentrifugiert und mit 1,3 ml H₂O das Ausgangsvolumen wiederhergestellt. Die optische Dichte der lysierten Zellen wird photometrisch gemessen. Die Extinktion bezeichnet man als OD_{Pr}.

Berechnung der eff. Mol. C2 / ml:

Da bei dieser Methode der Anteil der nicht lysierten Zellen, der vorher als 1 - y bezeichnet wurde, direkt gemessen wird, lautet die Formel für die Berechnung der z-Werte folgendermaßen:

$$Z = z_{Pr} - z_{CBC}$$

$$= -\ln \frac{OD_{Pr}}{OD_{100\%}} + \ln \frac{OD_{CBC}}{OD_{100\%}}$$

Die effektive Molekülzahl ergibt sich wiederum durch Multiplikation der z-Werte mit der Zellzahl und der Serumverdünnung.

3. Statistische Verfahren

3.1 Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s)

$$\text{Formel: } \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$s_x = \sqrt{\frac{(\sum x_i)^2}{n} - \frac{1}{n} (\sum x_i^2)} \\ n - 1$$

3.2 Regression und Korrelation

$$\text{Regressionsgleichung: } y = a + bx$$

$$\text{Regressionskoeffizient: } b = \frac{n \sum x y - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$\text{Korrelationskoeffizient: } r = \frac{\sum x y - (\sum x)(\sum y)/n}{n \cdot s_x \cdot s_y}$$

3.3 Vergleich zweier Regressionen (nach Weber, 1967)

$$t = \frac{b_2 - b_1}{s(b_2 - b_1)} \quad \begin{array}{l} \text{Testgröße zum Vergleich zweier} \\ \text{Regressionskoeffizienten} \\ b_1 \text{ und } b_2 \end{array}$$

$$s(b_2 - b_1) \quad \begin{array}{l} \text{Standardabweichung der Differen-} \\ \text{zen zweier Regressionskoeffizien-} \\ \text{ten } b_2 \text{ und } b_1. \end{array}$$

ERGEBNISSE

1. Normalwerte

Die in der Versuchsbeschreibung angegebenen Bestimmungen wurden an einem Seren-Kollektiv von 189 Personen durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme als klinisch gesund galten. Dieser Personenkreis setzte sich aus Mitarbeitern unseres Labors, Neueinstellungen des Klinikpersonals, Patienten der hiesigen orthopädischen Klinik und Augenklinik, Bediensteten der Bereitschaftspolizei und Patientinnen der hiesigen Frauenklinik zusammen. Es wurden bei der Auswahl der Seren Alter und Geschlecht nicht berücksichtigt.

1.1 Normalwerte für das Vollkomplement

Die Bestimmung des Vollkomplements mit der CH50 Methode ergibt bei 189 Seren einen Mittelwert von 40,0 E/ml mit einer Standardabweichung von $S = \pm 8,5$ E/ml. Multipliziert man die Standardabweichung mit dem Toleranzfaktor 1,96, so kann man einen Bereich festlegen, in dem mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit ein zufällig ermittelter Stichprobenwert zu liegen kommt. Dieses sog. Toleranzintervall erstreckt sich für diese mit der CH50 Methode bestimmten Normalseren von 23,1 - 57,0 E/ml. Das heißt, 95 % der Normalseren liegen in diesem Bereich. Die restlichen, außerhalb dieses Intervalls liegenden Seren zeigen im oberen Bereich eine größere Streubreite; sie reichen bis zu 70 E/ml, während die unteren Werte nur bis zu 20 E/ml herabreichen (vgl. Histogramm).

Methodenfehler:

Zur Berechnung des Methodenfehlers wurden 38 Bestimmungen eines Standardserums herangezogen, die an verschiedenen Tagen mit den zu testenden Seren gleichzeitig angesetzt worden waren. Bei einem Mittelwert von 38,9 E/ml und einer

Standardabweichung von 2,6 E/ml ergibt sich also ein Variationskoeffizient von 6,7 %. Folglich muß bei diesem Test ein Methodenfehler von ungefähr 7 % berücksichtigt werden.

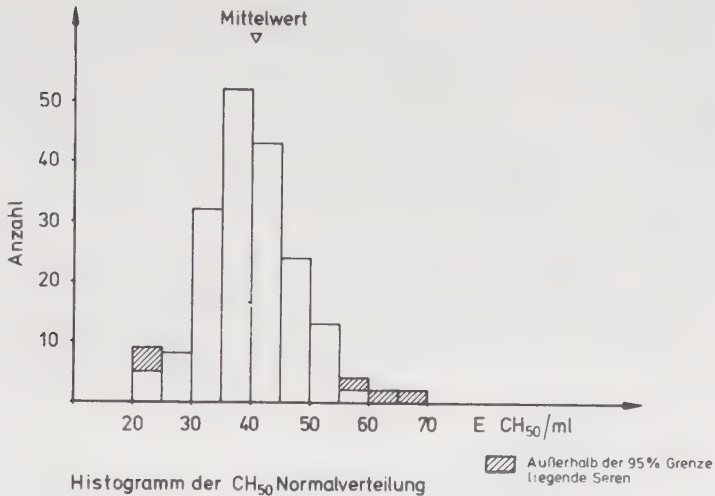
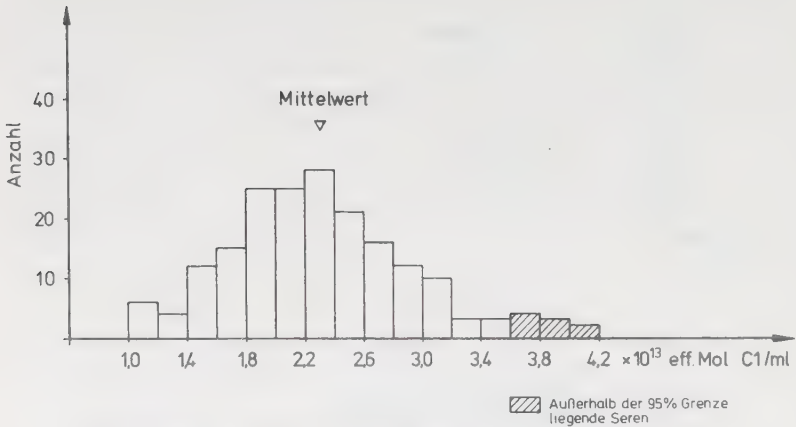


Abb. 2: Streuung der 189 Normalseren um den Mittelwert von 40,0 E CH₅₀/ml

1.2 Normalwerte für die effektive Molekülzahl der ersten Komponente (C1)

Bei der Bestimmung der effektiven Moleküle C1/ml errechnet sich bei 189 Seren ein Mittelwert von $2,30 \times 10^{13}$ eff. Mol./ml mit einer Standardabweichung von $\pm 0,64$. Das Toleranzintervall, bei dem mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit das Normalserenkollektiv zu finden ist, liegt zwischen 1,02 und 3,58 eff. Mol./ml. Bei der graphisch dargestellten Häufigkeitsverteilung ist auffällig, daß eine Streuung außerhalb der 95 % Grenze nur oberhalb dieser Grenze angetroffen wird.

Der Methodenfehler für diese Molekularbestimmung zeigte einen Wert von 13,8 %. Er wurde aus 42 verschiedenen C1 Bestimmungen des Standardserums ermittelt.



Histogramm der C1 Normalverteilung

Abb. 5: Streuung der 189 Normalseren um den Mittelwert von $2,30 \times 10^{13}$ eff. Mol.C1/ml

1.3 Normalwerte für die effektive Molekülzahl der zweiten Komplementkomponente (C2)

Aus den 189 Untersuchungen ergibt sich ein Mittelwert von $5,52 \times 10^{11}$ eff. Mol./ml mit einer Standardabweichung von $\pm 1,35$. Das Toleranzintervall erfaßt einen Bereich von 2,7 - 8,2 eff.Mol./ml.

Als Methodenfehler wurde ein Wert von 20 % ermittelt, der einer Standardabweichung von 0,95 eff.Mol./ml bei einem aus 40 Versuchen berechnetem Mittelwert des Standardserums von 4,74 eff.Mol./ml entspricht.

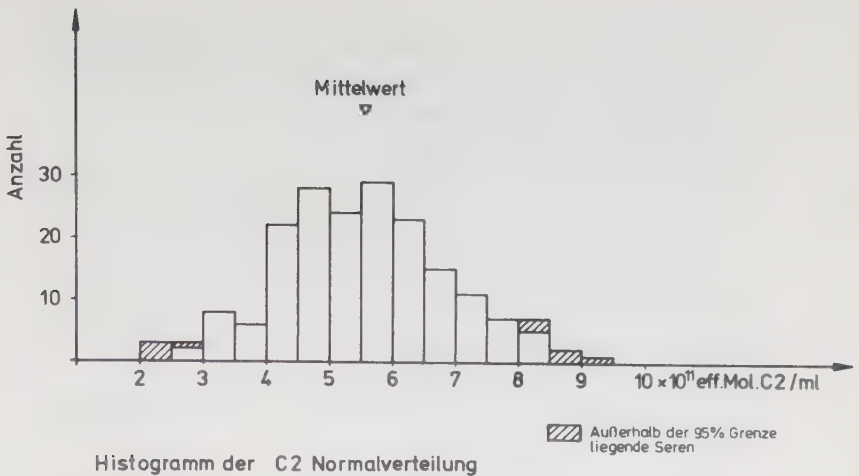


Abb. 4: Streuung der 189 Normalseren um den Mittelwert von $5,52 \times 10^{11} \text{ eff. Mol. C2 / ml}$

2. Vergleichende C2 Bestimmung mit Meerschweinchen- und Ratten-C-EDTA

Um der in der Einleitung genannten Problematik nachzugehen, muß erstens die durch die Bestimmung mit Ratten-C-EDTA erhaltene Steigerungsrate bei einer Gruppe von Normalseren untersucht, zweitens die gleiche Steigerungsrate für eine Gruppe pathologischer Seren ermittelt und drittens ein Vergleich zwischen beiden Ergebnissen durchgeführt werden.

2.1 Relation zwischen beiden Bestimmungsmethoden bei Normalseren

Bei einem Kollektiv von 55 Seren wurden C2 Bestimmungen sowohl mit gp als auch mit Ratten-C-EDTA durchgeführt. Die mit Ratten-C-EDTA erhaltenen Werte zeigten gegenüber den mit gp C-EDTA bestimmten Erhöhungen um das 8,5 bis 12,3fache.

Um ein Maß für die Beziehung zwischen beiden Messungen zu erhalten, wurde durch Gegenüberstellung der jeweils entsprechenden Meßwerte (gp:Ratten) der Korrelationskoeffizient berechnet. Dieser ergab einen Wert von + 0,832, was einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen beiden Verfahren zum Ausdruck bringt, da der Wert nahe an die obere Grenze von +1 heranreicht. Der Korrelationskoeffizient liegt immer in dem Bereich von +1 bis -1, wobei ein Wert von 1 einen völlig gesetzmäßigen Zusammenhang beinhaltet. Zur Prüfung, wie sich eine Änderung des einen Wertes um einen bestimmten Betrag durchschnittlich in der Größe des anderen ausdrückt, wurde die Regressionsgerade ($y = a + bx$) berechnet, in der der mit Ratten-C-EDTA erhaltene Wert in Abhängigkeit von dem mit gp C-EDTA bestimmten ausgedrückt wird. Der Faktor b entspricht dem Regressionskoeffizienten und gibt die Steigung der Geraden an. Er kann zur Umrechnung von x auf y herangezogen werden. Die für die Normalwerte berechnete Regressionsgleichung lautet:

$y = 11,43x - 5,15$, wobei x für den gp-Wert und y für den Ratten-Wert steht.

Aus 19 Untersuchungen des Standardserums wurde für die Bestimmung der effektiven Moleküle mit Ratten-C-EDTA ein Methodenfehler von 25 % ermittelt.

2.2 Relation zwischen beiden Bestimmungsmethoden bei pathologischen Seren

Das pathologische Seren-Kollektiv setzte sich aus 34 Seren zusammen, deren C2 Werte unterhalb des 90 %igen Toleranzintervalls ($s \times 1,64$) lagen und deren Spender klinisch manifeste Erkrankungen zeigten. Dazu gehörten Lebererkrankungen, Glomerulonephritis, nephrotisches Syndrom, Pneumonie mit Ak-Mangelsyndrom, progressive Sklerodermie, Leptospiroseinfekt und Herzinfarkt.

Bei diesen Seren wurden wiederum beide Bestimmungsmethoden angewandt. Diesmal lagen die mit Ratten-C-EDTA gemessenen Werte um das 6,5 - 12,5fache höher. Der Schwankungsbereich der Steigerungsrate war sowohl nach oben als auch nach unten etwas vergrößert im Vergleich zu dem, der bei den Normalseren auftrat. Dies zeigt sich auch in dem niedrigeren Korrelationskoeffizienten von 0,79, der aber auch noch einen statistisch signifikanten Zusammenhang beider Meßmethoden beinhaltet. Die Regressionsgerade lautet folgendermaßen:

$y = 8,36x + 1,87$, wobei y wieder den Ratten-Wert und x den gp-Wert darstellt.

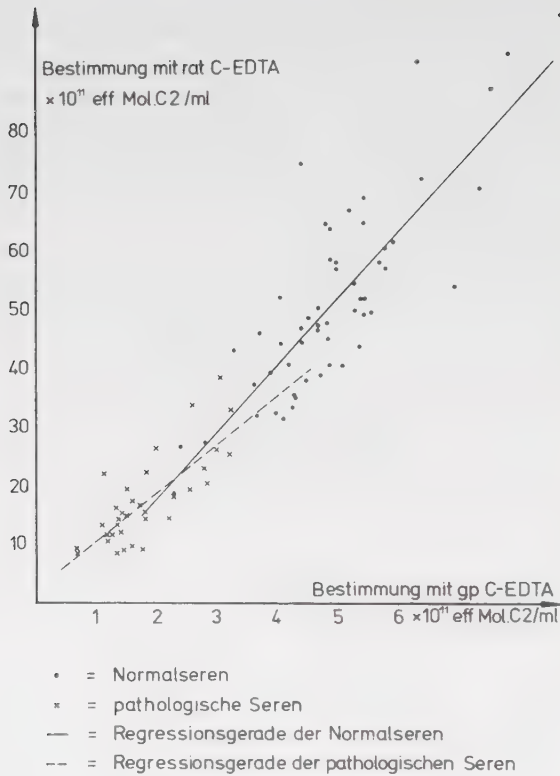


Abb. 5: Beziehung zwischen den gemessenen C2 Werten unter Verwendung von gp und Ratten-C-IDTA sowohl bei Seren von gesunden Personen als auch bei Seren von Patienten mit erniedrigtem C2 Gehalt.

2.3 Vergleich

Um zu prüfen, ob beide Regressionskoeffizienten in der Grundgesamtheit gleich sind und die geringen Differenzen nur auf Zufallsschwankungen beruhen, wurden die Regressionen beider Gruppen miteinander verglichen. Der Vergleich ergab, da die kritische 5 %-Schranke der t-Verteilung nicht überschritten wurde, daß beide Geraden nur zufällig voneinander verschieden sind und ebensogut durch eine Gerade ersetzt werden können. Somit haben sich die Unterschiede in der Steigerungsrate als statistisch nicht signifikant herausgestellt. Die für beide Gruppen gemeinsame Regressionsgerade sieht folgendermaßen aus:

$$y = 10,94x - 2,83$$

Bei beiden Gruppen wird also durch Verwendung von Ratten-C-EDTA eine durchschnittlich 10fach höhere Effektivität des C2 Moleküls gemessen.

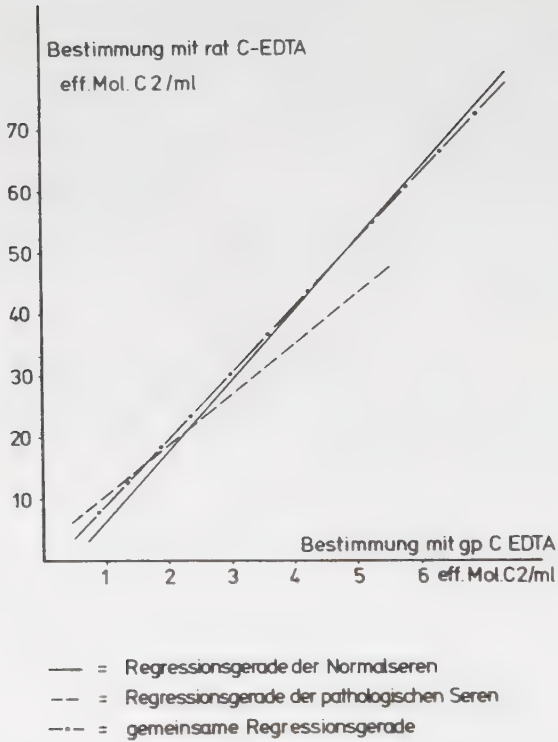


Abb. 6: Darstellung der verschiedenen Regressionsgeraden

DISKUSSION

Genau wie in den meisten Laboratorien wurde auch in dieser Arbeit zur Bestimmung des Vollkomplements die 1961 von Mayer beschriebene CH50-Methode angewandt. Da diese Methode schon sehr lange durchgeführt wird und seit ihrer ersten Beschreibung keine Veränderung erfahren hat, lassen sich in der Literatur eine ganze Zahl vergleichbarer Werte finden, die von anderen Arbeitsgruppen als Normalwerte ermittelt wurden. Die erfaßten Personenkollektive umfaßten zwischen 10 und 60 Personen, zum Teil waren keine Angaben über die Zahl der untersuchten Personen gemacht.

Eine Auswahl angegebener Normalwerte zeigt folgende Zusammenstellung:

Austen, Scheffer	1965	32-44	E CH50/ml	20 Pers.
Klemperer et al.	1965	25-50	"	25 "
Schubart et al.	1965	25-59	"	60 "
Townes	1967	25-45	"	50 "
Gewurz et al.	1967	49 $\pm$ 8	"	58 "
Humair	1968	40-58	"	
Cooper et al.	1968	25-40	"	
Kohler, Ten Benschel	1969	44 $\pm$ 6	"	35 "
Ruddy et al.	1970	32-45		
Gabriel et al.	1972	25-63	"	57 "

Stärker abweichende Werte, wie sie von Cass et al. (1968) (80-160 E) oder Petz et al. (1968) (96-180 E) angegeben werden, sind durch Abänderungen der Methode bedingt und beruhen unter anderem auf einem geringeren Zellansatz.

Die Streubreite der oben aufgeführten Werte kommt wohl durch die Untersuchung relativ kleiner Personenkreise zustande. Die Mittelwerte liegen zwischen 35 und 49 E/ml. Die untere Grenze der Normalbereiche liegt bei 25, die obere zwischen 60 und 63 Einheiten. Dabei ist zu berücksichtigen, daß in einigen Fällen die einfache Standardabweichung, in anderen aber die doppelte als Grenzbereich angenommen wurde. Die in dieser Arbeit von

189 Personen erhaltenen Werte von 40 ± 8 E/ml bzw. 40 ± 16 bei Einbeziehung der zweifachen Standardabweichung, entsprechend dem 95 % Toleranzintervall, lassen sich gut in die angegebenen Bereiche einordnen und können weiteren Untersuchungen als Basis dienen.

Für die Komponenten C1 und C2 lassen sich in der Literatur weniger vergleichbare Werte finden, was wohl in den aufwendigeren und relativ jüngeren Methoden begründet liegt. Die für eine genaue quantitative Bestimmung unzulängliche Titration mit R- Reagenzien wurde durch die Bestimmung effektiver Moleküle abgelöst. Bei Einhaltung bestimmter Parameter erlaubt diese Methode nun eine Meßung vergleichbarer und reproduzierbarer Werte. Die Angaben der auf diese Art und Weise erhaltenen Werte erfolgen bei den meisten Autoren in der Einheit "Unit". Ein "Unit" wird definiert als das Reziproke der Serum-Verdünnung, die ein SAC142 "site" pro Zelle produziert (Austen und Beer, 1964). Dies entspricht:

Z (= Zahl der durchschnittlichen Läsionen/Zelle) x rel. Verdünnung.

Wenn in diesen Wert noch die eingesetzte Zellzahl mit eingeht, erhält man die effektive Molekülzahl.

Der Bestimmung der effektiven C1 Moleküle wurde in dieser Arbeit die 1965 von Borsos und Rapp beschriebene Methode zugrunde gelegt. Eine Auswahl in der Literatur angegebener Normalwerte, die nach der gleichen Methode erhalten wurden, zeigt die folgende Zusammenstellung. Durch Multiplikation der angegebenen Units mit der eingesetzten Zellzahl wurde die effektive Molekülzahl erhalten.

Cooper et al.	1968	1- 4	$\times 10^{13}$	eff.Mol./ml
Ruddy et al.	1970	1,45- 2,64	$\times 10^{13}$	" " "
Petz	1971	$1,27 \pm 0,72$	$\times 10^{13}$	" " "
Caldwell et al.	1972	1,44- 3,00	$\times 10^{13}$	" " "

Die auftretende Schwankungsbreite läßt sich wohl auf methodische Differenzen zurückführen. Allgemein kommt jedoch eine Deckung mit dem in dieser Arbeit ermittelten Normalbereich von $2,3^{+0,6}$ eff.Mol./ml, bzw. bei Einbeziehung des 95 % Toleranzintervalls $2,3^{+1,2}$, zustande.

Der hämolytische C2-Test wurde erst in den letzten Jahren in der Form entwickelt, die heute allgemein angewandt wird. In den ersten Beschreibungen von Borsos et al. (1961) und Austen und Beer (1964) wird eine Zahl von Störfaktoren erwähnt, die in diesen Test eingreifen und das Ergebnis beeinflussen, die aber durch geeignete Korrekturfaktoren ausgeglichen werden können. Die Problematik, daß der eingesetzte $EAC1_{gp}^4$ Komplex für die Bestimmung der Human-C2 Moleküle keine optimalen Bedingungen infolge einer Inkompatibilität zwischen $C4_{gp}$ und $C2_{hu}$ liefert, wurde später von Gewurz et al. (1967) aufgegriffen. Durch den Einsatz von $EAC4_{hu}$ Zellen (Borsos and Rapp, 1967) liessen sich in der folgenden Zeit wesentlich bessere und reproduzierbare Ergebnisse erzielen:

Cooper et al. 1968	1-2	$\times 10^{11}$	eff.Mol./ml
Ruddy et al. 1970	2-3,8	$\times 10^{11}$	" " "
Caldwell et al. 1972	2-3,9	$\times 10^{11}$	" " "

Diese Werte liegen jedoch immer noch unterhalb des in dieser Arbeit errechneten Normalwerts von $5,5 \times 10^{11}$ eff.Mol./ml bei einer Standardabweichung von $\pm 1,3 \times 10^{11}$. Die relativ hohe Störanfälligkeit der C2 Titration, die sich in dem Methodenfehler von fast 20 % widerspiegelt, beruht sicherlich neben technischen Fehlern auch auf der Art des Tests. Ihm liegt nämlich nicht, wie bei der C1 Titration, eine Endpunktbestimmung zugrunde, sondern er basiert wegen des raschen Zerfalls des $EAC142$ Komplexes auf der Kinetik der Reaktion.

Die Normalwerte, besser gesagt die Normalbereiche, wie sie in dieser Arbeit für das Vollkomplement und die Faktoren C1 und C2 aufgestellt wurden, können jedoch nur mit Vorbehalt zur Beur-

teilung der von Patienten erhaltenen Werte dienen, da ein normaler Wert nur ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau beinhaltet und ein erheblicher Verbrauch infolge eines pathologischen Prozesses möglicherweise so kompensiert werden kann, daß die Serumwerte völlig unauffällig bleiben. Auch können lokale Komplementaktivierungen, wie z.B. in der Synovialflüssigkeit bei der rheumatoiden Arthritis (Lundh et al, 1970) oder im Liquor cerebrospinalis beim LL mit ZNS-Beteiligung den Serumspiegel ganz unbeeinflusst lassen (Petz et al, 1971). Genauere Studien über Synthese und Abbauraten können in fraglichen Fällen weiteren Aufschluß geben. Erstrebenswert ist auch eine Kombination der hämolytischen Tests mit der proteinchemischen Bestimmung nach der Mancini-Methode. So können sowohl hämolytisch inaktive Faktoren als auch Proteine mit hoher Aktivität erfaßt werden.

Eine Schwierigkeit stellt die Abgrenzung des Normalbereichs gegenüber einem pathologischen Bereich dar. In einem Abschnitt werden sich sicherlich beide überschneiden, und ein Teil wird nicht als pathologisch erkannt werden. Diesem Problem wollen wir damit begegnen, daß wir die Werte, die in den Bereich zwischen der einfachen und der doppelten Standardabweichung fallen, als fraglich pathologisch ansehen.

Im folgenden interessiert die Frage nach der Ursache für die unterschiedliche Effektivität von Ratten- und Meerschweinchen-C-EDTA. Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Verwendung von Ratten-C-EDTA als "late acting components" zur Bestimmung hämolytisch aktiver Moleküle für die zweite und vierte Komplementkomponente um ein Vielfaches höhere Werte erhalten werden als mit Meerschweinchen-C-EDTA (Miyakawa, 1969). Unter optimalen Bedingungen kann auf diese Weise jedes an die Zelle gebundene C4 und C2 Molekül auf Grund seiner hämolytischen Aktivität nachgewiesen werden (Opferkuch et al, 1971).

Die Möglichkeit, daß Inhibitoren im Meerschweinchenserum die Entwicklung hämolytisch aktiver "sites" verhindern, wurde von Borsos (1970) mit folgenden Begründungen abgelehnt: Erstens beeinflußt die gp C-EDTA-Konzentration nicht das Ausmaß der Lyse, zweitens können alle SAC142"sites" nachgewiesen werden, wenn C1 limitierender Faktor ist, drittens zeigen gp und Ratten-C-EDTA gleiche Effektivität bei der Bestimmung hämolytisch aktiver C1 Moleküle. Unberücksichtigt bleibt bei dem ersten Argument jedoch die Möglichkeit, daß sich bei der Erhöhung der gp C-EDTA-Konzentration ein Gleichgewicht zwischen erhöhter Inhibitormenge und hämolytisch aktiven Faktoren einstellen kann, das die Meßergebnisse unbeeinflußt läßt. Den beiden anderen Argumenten stehen Befunde von Opferkuch et al. (1971) gegenüber, die beweisen, daß sich um einen EAC1"site" mehrere C42 Komplexe gruppieren und die Zahl dieser Komplexe größer ist, wenn C1 limitierender Faktor ist, als wenn C4 oder C2 in beschränkter Menge eingesetzt werden. Wird bei der C1 Bestimmung ein Feil dieser Komplexe gehemmt, so bleibt der Lysegrad dadurch unbeeinflußt, da ja ein einziger hämolytisch aktiver Bezirk zur Lyse genügt.

In Anlehnung an Untersuchungen von Koethe et al. (1973) wäre die Bildung von Inhibitoren eine mögliche Erklärung für die verminderte gp C-EDTA Effektivität. Koethe wies nach, daß bei einer Aktivierung des Komplementsystems über den "alternate pathway" eine Inhibition der Lyse nach dem klassischen Reaktionsablauf eintritt, die durch eine Blockierung von EAC142 und EAC1423 Intermediärkomplexen durch Komplexe terminaler Komponenten zustande kommt. Bei der Verwendung von Ratten-C-EDTA dürften keine derartigen Inhibitoren die Reaktion stören, da mit diesen "late acting components" eine hundertprozentige Effektivität im Hinblick auf den Nachweis von C4 und C2 erzielt werden kann.

Als Ursache für die unterschiedliche Effektivität der "late acting components" muß auch das Vorliegen verschiedener Kom-

ponentenpopulationen, die sich durch ihre jeweilige Reaktionsfähigkeit mit gp und Ratten-C-EDTA unterscheiden, in Erwägung gezogen werden. Colten et al. (1970) konnten für die zweite Komplementkomponente von Meerschweinchen durch Bestimmung des isoelektrischen Punktes einen Polymorphismus nachweisen. Die beiden so ermittelten C2 Fraktionen liessen sich jedoch weder auf Grund funktioneller noch physikalischer Eigenschaften differenzieren. In dieser Arbeit sollte nun weiter der Frage nach dem Vorhandensein zweier verschiedener Komponentenarten nachgegangen werden. Dazu wurde die erhöhte Effektivität von Ratten-C-EDTA in der C2 Bestimmung bei einer Gruppe von Normalseren mit der Erhöhung bei einer Gruppe pathologischer Seren verglichen. Die bei den Normalseren ermittelte Steigerungsrate von ca. 8,5 bis 12,3 deckt sich mit den schon bei Opferkuch et al. (1971) beschriebenen Werten von 8- 13,4. Die Rate für die pathologischen Seren zeigt eine etwas größere Schwankungsbreite, die sich jedoch beim Vergleich beider Regressionen als Zufallsschwankung ohne Signifikanz herausstellt. Dies bedeutet aber nicht, daß bei Untersuchungen größerer Stichproben nicht auch signifikante Abweichungen beider Regressionen möglich gewesen wären, bei denen es sich aber, falls sie nur durch die Untersuchung größerer Gruppen nachweisbar gewesen wären, nur um minimale Unterschiede handeln dürfte. Diese wären für unsere Fragestellung ohne praktische Bedeutung gewesen. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man annehmen, daß mit beiden Bestimmungsmethoden nicht unterschiedliche C2 Populationen erfaßt werden. Änderungen in der Steigerungsrate bei pathologischen Seren hätten die Vermutung bestätigt, daß zwei verschiedene Arten der zweiten Komplementkomponente existieren, die bei Erkrankungen mit Beteiligung des Komplementsystems unterschiedlich betroffen werden.

Diese Ergebnisse lassen die Annahme zweier verschiedener Komponentenpopulationen nicht zu, sondern deuten eher auf

eine Störung der Komplementreaktion mit gp C-EDTA durch Inhibitoren hin, die entweder als solche schon im Serum vorliegen oder während des Reaktionsablaufs gebildet werden. Bei der Reaktion mit Ratten-C-EDTA muß das Fehlen solcher Inhibitoren postuliert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es werden unter Anwendung hämolytischer Bestimmungsmethoden Normalwerte für das Vollkomplement (CH50) und die effektiven Moleküle der ersten (C1) und zweiten (C2) Komplementkomponente im Humanserum bestimmt. Aus einem Kollektiv von 189 Seren werden folgende Normalwerte ermittelt:

CH50: $40,0 \pm 8,5$ E/ml; C1: $2,30 \pm 0,64 \times 10^{13}$ eff.Mol./ml
C2 : $5,52 \pm 1,35 \times 10^{11}$ eff.Mol./ml.

2. Bei der Bestimmung der effektiven Moleküle der zweiten Komplementkomponente wird zum einen gp C-EDTA und zum anderen Ratten-C-EDTA als "late acting components" verwendet. Mit beiden Bestimmungsmethoden werden sowohl Seren gesunder Personen (Normalseren) als auch Patientenserum mit erniedrigtem C2 Gehalt getestet. Die Relation zwischen beiden Testmethoden wird für beide Kollektive untersucht und miteinander verglichen. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Diese Befunde sprechen gegen die Möglichkeit, daß zwei verschiedene C2 Populationen existieren, die sich durch ihre unterschiedliche Effektivität mit Meer-schweinchen- und Ratten-C-EDTA unterscheiden, da durch pathologische Prozesse, die zu einer Erniedrigung des C2 Gehaltes im Serum führen, keine Änderung der Relation zwischen den beiden angenommenen Populationen auftritt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAMSON, N. et al.
Deficiency of C3 inactivator in man.
J. Immunol. 107, 19 (1971)
2. ALPER, C.A. et al.
Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement-mediated functions and of the third component of complement (C3).
N. Engl. J. Med. 282, 349 (1971)
3. ALPER, C.A., F.S. ROSEN, P.J. LACHMANN
Inactivator of the third component of complement as an inhibitor in the properdin pathway.
Proc.nat.Acad.Sc. (Wash.) 69, 2910 (1972)
4. AUSTEN, K.F., F. BEER
The measurement of second component of human complement (C₂^{hu}) by its interaction with EAC₁1a₆P, 4₆P cells.
J. Immunol. 92, 946 (1964)
5. AUSTEN, K.F., A.L. SCHEFFER
Detection of hereditary angioneurotic edema by demonstration of a reduction in the second component of human complement.
New. Engl. J. Med. 272, 649 (1965)
6. BITTER-SUERMAN, D.
Aktivierung des Komplementsystems - Ein Monopol des Immunkomplexes ?
Klin.Wschr. 50, 277 (1972)
7. BORSOS, T., W. OPFERKUCH
Kinetics and assay of complement components:
Clustering and hemolytic competence of C₄ complexes at a single site.
In: Biological activities of complement
Hrsg.: Karger, S., Basel (1972), S. 27 ff.

8. BORSOS, T., H.J. RAPP
Chromatographic separation of the first component of complement and its assay on a molecular basis.
J. Immunol. 91, 851 (1963)
9. BORSOS, T., H.J. RAPP
Immune hemolysis: A simplified method for the preparation of EAC'₄ with guinea pig or with human complement.
J. Immunol. 99, 263 (1967)
10. BORSOS, T., H.J. RAPP, H.R. COITEN
Immune hemolysis and the functional properties of the second (C₂) and fourth (C₄) components of complement.
I. Functional differences among C₄ sites on cell surfaces.
J. Immunol. 105, 1439 (1970)
11. BORSOS, T., H.J. RAPP, M.M. MAYER
Studies on the second component of complement.
I. The reaction between EAC'_{1,4} and C'₂; Evidence on the single site mechanism of immune hemolysis and determination of C'₂ on a molecular basis.
J. Immunol. 87, 310 (1961)
12. BORSOS, T., H.J. RAPP, M.M. MAYER
Studies on the second component of complement.
II. The nature of the decay of EAC'_{1,4,2}.
J. Immunol. 87, 326 (1961)
13. BOYER, J.T., C.F. HINZ
Complement and cold agglutinins.
I. Complement coating of normal human erythrocytes by cold agglutinins.
Clin. Exp. Immun. 2, 229 (1967)
14. CALDWELL, J.R. et al.
Acquired C1 inhibitor deficiency in lymphosarcoma.
Clin. Immunol. Immunopath. 1, 39 (1972)

15. CASS, R.M. et al.
Immunoglobulins G, A and M in systemic lupus erythematosus.
Ann. Intern. Med. 69, 749 (1968)
16. COCHRANE, C.G.
Studies on the localization of circulating antigen-antibody complexes and other macromolecules in vessels: I. Structural studies.
J. Exp. Med. 118, 489 (1963)
17. COLTEN, H.R., T. BORSOS, H.J. RAPP
Isoelectric focusing of human and guinea-pig C2: Polymorphism of guinea-pig C2.
Immunology 18, 467 (1970)
18. COLTEN, H.R. et al.
Purification of the first component of complement by zonal ultracentrifugation.
J. Immunol. 104, 862 (1969)
19. COOPER, N.R., M.J. POJLEY, H.J. MÜLLER-EBERHARD
The second component of human complement (C2). Quantitative molecular analysis of its reaction in immune hemolysis.
Immunochemistry 7, 341 (1970)
20. COOPER, N.R., R. TEN-BINSEL, P.F. KOHLER
Studies of an additional kindred with hereditary deficiency of the second component of human complement (C2) and description of a new method for the quantitation of C2.
J. Immunol. 101, 1176 (1968)
21. DIXON, F.J. et al.
Pathogenesis of serum sickness.
Arch. Path. 65, 18 (1958)

22. DONALDSON, V.H., R.R. EVANS
A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema. Absence of serum inhibitor of C¹ esterase.
Am. J. Med. 35, 37 (1963)
23. GABRIEL, R., A.A. GLYNN, A.M. JOEKES
Raised complement in nephritis. Prognostic significance.
Lancet 8, 55 (1972)
24. GEWURZ, H. et al.
Complement activity and inflammatory neutrophil exudation in man. Studies in patients with glomerulonephritis, essential hypocomplementemia and a gammaglobulinemia.
Int. Arch. Allergy 32, 64 (1967)
25. GEWURZ, H. et al.
The complement profile in acute glomerulonephritis, systemic lupus erythematosus and hypocomplementemic chronic glomerulonephritis.
Int. Arch. Allergy 34, 556 (1968)
26. GOTTSSTEIN, U., D.J. YOO, H. BÜTTNER
C¹-Esterase und C¹-Esterase-Inhibitor im Serum von Kranken mit hereditärem genuinen Quincke-Ödem.
Klin. Wschr. 45, 230 (1967)
27. HARBOE, M. et al.
Identification of the components of complement participating in the antiglobulin reaction.
Immunology 6, 412 (1963)
28. HEDBERG, H.
Studies on the depressed hemolytic complement activity of synovial fluid in adult rheumatoid arthritis.
Acta Rheum. Scand. 9, 165 (1963)

29. HUMAIR, L.M.

β_{1c} -globulin and complement in nephritis. Serological and immunohistochemical studies in acute, chronic, membranous and lupus glomerulonephritis.

New. Med. Acta 34, 279 (1968)

30. KLEMPERER, M.R.

Hereditary deficiency of the second component of complement in man.

J. Immunol. 102, 168 (1969)

31. KLEMPERER, M.R. et al.

Estimation of the serum beta-1c-globulin concentration: Its relation to the serum hemolytic complement titer.

Pediatrics 35, 765 (1965)

32. KLEMPERER, M.R. et al.

Hereditary deficiency of the second component of complement (C'2) in man.

J. Clin. Invest. 45, 880 (1966)

33. KNIKER, W.T., C.G. COCHRANE

Pathogenetic factors in vascular lesions of experimental serum sickness.

J. Exp. Med. 122, 83 (1965)

34. KOETHE, S.M., K.F. AUSTEN, I. GIGLI

Blocking of the hemolytic expression of the classical complement sequence by products of complement activation via the alternate pathway.

J. Immunol. 110, 390 (1973)

35. KOFFLER, D., P.H. SCHUR, H.G. KUNKEL

Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus.

J. Exp. Med. 126, 607 (1967)

36. KOHLER, P.F., R. TEN-BENSEL

Serial complement component alteration in acute glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus.

Clin. Exp. Immunol. 4, 191 (1969)

37. LANDERMAN, N.S. et al.

Hereditary angioneurotic edema.

II. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and / or plasma kallikrein.

J. Allergy 33, 330 (1962)

38. LANGE, L., L. WASSERMAN, L. SLOBODY

The significance of serum complement levels for the diagnosis and prognosis of acute and subacute glomerulonephritis and lupus erythematosus disseminatus.

Ann. Int. Med. 53, 636 (1960)

39. LUNN, B., G. NEPPING, A. LAUREN

Studies of the third component of complement in synovial fluid from arthritic patients.

I. Immunochemical quantitations and relation to total complement.

Clin. Exp. Immunol. 6, 407 (1970)

40. MENCINI, G., A.C. CARBONARA, J.P. HOUMANS

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.

Immunochemistry 2, 255 (1965)

41. MAYER,

Complement and complement fixation.

In: Experimental Immunochemistry

Edited: Cabat, L.A., M.M. Mayer

(1961) (1961) S. 1-11

42. MAYER, M.M.

Development of the one-hit theories of immune hemolysis

In: Immunological approaches to problems in microbiology, Edited: M. and G. M. Mayer

University Press, Brunswick, N.Y (1961) S. 268 ff.

of hemolysis by complement.

Grund. Symp. Complement

G.F.W. Colstenholme, J. Knight
Ed., London (1965)

44. MILLER, M.E. et al.

A familial plasma-associated defect of phagocytosis.
Lancet 2, 60 (1968)

45. MILLER, J.A. and M.M. MAYER

On the cleavage of C'2 by C'1a; Immunological and physical comparisons of C'2a^d and C'2a/i.

Proc. Exp. Biol. Med. 129, 127 (1968)

46. MILLER, M.E., U.R. NILSON

A familial deficiency of humoral opsonic activity related to a dysfunction of the fifth component of complement (C5).

Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 155, 104 (1969)

47. MIYAKAWA, Y. et al.

High efficiency of SAC1^{GP4GP2GP} conversion to S with EDTA-treated rat serum.

J. Immunol. 103, 374 (1969)

48. OPFERKUCH, W. et al.

Immune hemolysis and the functional properties of the second (C2) and fourth (C4) components of complement.

II. Clustering of effective C₄2 complexes at individual hemolytic sites.

J. Immunol. 106, 407 (1971)

49. OPFERKUCH, W. et al.

Immune hemolysis and functional properties of the second (C2) and fourth (C4) components of complement. II¹. The hemolytic efficiency of human and guinea pig C2 and C4.

J. Immunol. 106, 927 (1971)

50. PETZ, L.D. et al.

In vivo metabolism of complement.

I. Metabolism of the third component (C3) in acquired hemolytic anemia.

J. Clin. Invest. 47, 2469 (1968)

51. PUTZ, L.D. et al.
Serum et cerebral spinal fluid complement and
serum autoantibodies in systemic lupus erythe-
matosus.
Medicine, 50, 259 (1971)
52. RAPP, H.J., T. BORSES
Effects of low ionic strength on immune hemolysis.
J. Immunol. 91, 826 (1965)
53. RAPP, H.J., T. BORSES
Molecular basis of complement action.
Appleton-Century-Crofts, New York (1970)
54. RINGELMANN, B. et al.
Komplementmessungen mit Hilfe des Mikrolitersystems.
Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 154, 529 (1969)
55. RUDY, S., F.K. AUSTEN
A stoichiometric assay for the fourth component
of complement in whole serum using EAC'1a^{GP} and
functionally pure human second component.
J. Immunol. 99, 1162 (1967)
56. RUDY, S., T. GHIL, F.K. AUSTEN
The complement system of man.
New Engl. J. Med. 287, 642 (1972)
57. RUDY, S. et al.
Hereditary deficiency of the second component
of complement (C2) in man: Correlation of C2
hemolytic activity with immunochemical measure-
ments of C2 protein.
Immunology 18, 945 (1970)
58. SCHUMBERG, A.F. et al.
Serum complement levels in rheumatoid arthritis.
Ann. Rheum. 24, 439 (1965)

59. SHULMAN, N.R.

A mechanism of cell destruction in individuals sensitized to foreign antigens and its implication in auto-immunity.

Ann. Intern. Med. 60, 506 (1964)

60. SCHUR, P.H., J. SANDSON

Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus.

New Engl. Med. 278, 533 (1968)

61. TAN, E.M., H.G. KUNKEL

An immunofluorescent study of the skin lesions in systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum. 9, 37 (1966)

62. TOWNES, A.S.

Complement levels in disease.

John Hopkins Med. J. 120, 337 (1967)

63. WEBER, E.

Grundriß der biologischen Statistik.

Stuttgart (1967), 6. Aufl., S. 358 ff.

64. WELLEK, B., W. OPFERKUCH

Die klinische Bedeutung des Komplements.

Dtsch.Med.Wschr. 98, 2356 (1973)

65. ZVAIFLER, N.J., T.J. PEKIN

Complement components in synovial fluids.

Clin. Res. 11, 180 (1963)

LEBENS LAUF

Am 16. Mai 1950 wurde ich als Tochter des Vermessungsamtsrats Otto Runkel und seiner Ehefrau Eleonore, geb. Moog geboren.

Von Ostern 1956 bis Ostern 1960 besuchte ich die evangelische Volksschule in Koblenz-Lützel und wechselte 1960 auf das staatliche Hildagymnasium in Koblenz über, wo ich im Sommer 1968 auf dem neusprachlichen Zweig die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1968 begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz das Studium der Medizin und legte dort im Sommer 1969 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Winter 1971 die ärztliche Vorprüfung ab. Zur Zeit bin ich im sechsten klinischen Semester und beabsichtige, mich in diesem Semester zum medizinischen Staatsexamen zu melden.

